

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



CN1097468

L1 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2004 THOMSON DERWENT on STN  
ACCESSION NUMBER: 1997-204188 [19] WPIDS  
DOC. NO. CPI: C1997-065691  
TITLE: Double-electrode complex enzyme sensor for  
determining  
glucose and cane sugar contents simultaneously.  
DERWENT CLASS: B04 D16 J04  
INVENTOR(S): HU, W; LEI-QING, L; ZHANG, X  
PATENT ASSIGNEE(S): (WUHA-N) WUHAN VIRUS INST CHINESE ACAD SCI  
COUNTRY COUNT: 1  
PATENT INFORMATION:

| PATENT NO  | KIND | DATE     | WEEK      | LA | PG  |
|------------|------|----------|-----------|----|-----|
| CN 1097468 | A    | 19950118 | (199719)* |    | <-- |

APPLICATION DETAILS:

| PATENT NO  | KIND | APPLICATION    | DATE     |
|------------|------|----------------|----------|
| CN 1097468 | A    | CN 1993-107865 | 19930630 |

PRIORITY APPLN. INFO: CN 1993-107865 19930630

AB CN 1097468 A UPAB: 19970512

A flowing injection type dual-electrode complex enzyme sensor comprises a  
glucose electrode, and a fixed catalase and sucrase electrode.  
Both  
electrodes with the fixed catalase between them are put in a  
flowing test  
pond to determine glucose and cane sugar simultaneously. The  
catalase can  
prevent H2O2 generated from glucose from interfering with the  
sucrase  
electrode.

**THIS PAGE BLANK**



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93107865.2

[51]Int.Cl<sup>5</sup>

C12Q 1/00

[43]公开日 1995年1月18日

[22]申请日 93.6.30

[71]申请人 中国科学院武汉病毒研究所

地址 430071湖北省武汉市武昌小洪山

[72]发明人 张先恩 雷青利斯 胡伟平

张治平 危宏平 张晓梅

曲红波 张煜

[74]专利代理机构 中国科学院武汉专利事务所

代理人 周春莲

C12Q 1/54

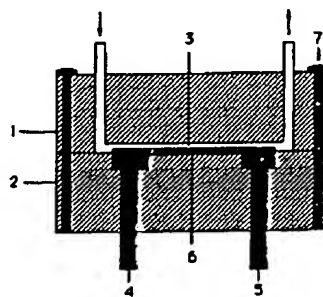
说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 同时测定葡萄糖和蔗糖的双电极复合酶传感器

## [57]摘要

本发明是关于生物传感器,特别是流动注射式双电极复合酶传感器的发明。该传感器由葡萄糖酶电极、固定化过氧化氢酶和蔗糖酶电极共同组成。将一只葡萄糖酶电极( $K_1$ )和一只蔗糖酶电极( $K_2$ )固定(制作)在一个流通测定池中,在两电极之间固定有一层过氧化氢酶,以消除电极  $K_1$  酶促反应产物  $H_2O_2$  对电极  $K_2$  的干扰。G/S 样品一次性流过双电极流通池,葡萄糖和蔗糖同时被测出。



# 权 利 要 求 书

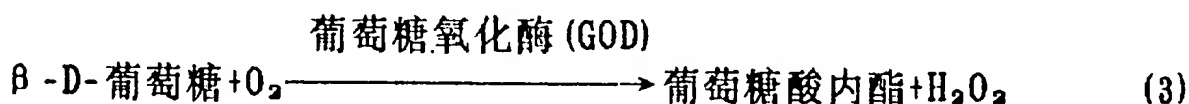
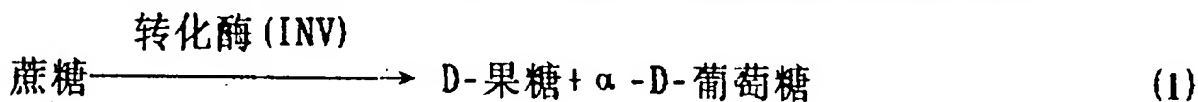
1. 一种用葡萄糖酶电极和蔗糖酶电极构成的流通式双电极复合酶传感器,其特征是:当注入含葡萄糖和蔗糖的混合样品时,根据响应值 $Y_1$ 和 $Y_2$ ,按式(6): $X_s = \{Y_2 - [a_2 + b_2(Y_1 - a_1)/b_1] - a_3\}/b_3$ 或式(7): $X_s = (Y_2 - b_2 Y_1/b_1)/b_3$ 或其衍生式计算出葡萄糖和蔗糖浓度。

2. 按照权项1所述,其特征是:在传感器装置中,若电极 $K_1$ 和电极 $K_2$ 为顺序安装(如图1),则在两电极之间固定有一层过氧化氢酶,以消除电极 $K_1$ 酶促反应产物 $H_2O_2$ 对电极 $K_2$ 的干扰,使 $K_2$ 的洗脱回复时间缩短。

## 同时测定葡萄糖和蔗糖的双电极复合酶传感器

本发明是关于生物传感器,特别是流动注射式双电极复合酶传感器的发明。该传感器由葡萄糖酶电极、固定化过氧化氢酶和蔗糖酶电极共同组成,可同时测定样品中的葡萄糖和蔗糖。

在食品和发酵工业及其相关科研中,常常需要测定葡萄糖和蔗糖。在各种测定方法中,以酶电极法最为快捷低耗。葡萄糖酶电极已经商品化,蔗糖酶电极也有一些研究报告,其酶促使反应原理如下:



测定 $\text{O}_2$ 的消耗或 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的产生可以对蔗糖定量。然而,当样品中葡萄糖与蔗糖共存时(简称G/S溶液),电极也对葡萄糖响应,蔗糖测定受到干扰。已知有三种解决办法:(1)在蔗糖酶电极表面加一层固定化GOD膜,使共存葡萄糖在扩散进入电极反应前被除去 [Scheller and Renneberg, Anal. Chim. Acta, 152 (1983): 265],该方法可排除葡萄糖干扰但不能测定葡萄糖;(2)结合采用GOD电极和固定化INV, G/S样品溶液经分流,一部分被GOD电极直接测定出葡萄糖浓度,另一部分以含固定化INV(酶管或酶柱)的旁路,其中蔗糖被转化成葡萄糖,再被GOD电极测定,根据两次响应值之差可算出蔗糖浓度 [Masoom and Townshend, Anal. Chim. Acta, 171 (1985): 185],该方法能同时测定葡萄糖和蔗糖,但酶柱(管)制作工艺较复杂,耗酶量大,易滞留气泡产生干扰;(3)用一只GOD电极先测定G/S样品中葡萄糖浓度,再用一只蔗糖酶电极对样器测定,将总的葡萄糖浓度减去GOD电极测定的葡萄糖浓度即为蔗糖浓度 [Xu and Guilbault, Anal. Chem. 61 (1989): 782; 胡伟平,张先恩等,生物工程学报, 7 (1991): 339],该方法的不足在于测定分两步进行,耗时较长。

本发明的任务是建立(提供)一种能适用于流动注射分析的双电极复合酶传感器,该传感器能用于G/S样品的葡萄糖和蔗糖同时测定。

解决的方案是:将一只葡萄糖酶电极( $K_1$ )和一只蔗糖酶电极( $K_2$ )固定(制作)在一个流通测定池中,G/S样器一次性流过双电极流通池,葡萄糖和蔗糖同时被测出。

下文及附图描述了本发明的一个实施例:

图1为双碳糊电极复合酶传感器及流通池结构示意图。

流通测定池由有机玻璃上下基座(1)和(2),流通池(3),GOD电极 $K_1$ (4)和蔗糖酶电极 $K_2$ (5)组成,在 $K_1$ 和 $K_2$ 之间的池底有一层固定化过氧化氢酶(CAT)(6),(1)和(2)通过螺丝(7)紧固。

酶电极的制作方法:6份石墨粉与4份矿物油(W:W)混合调匀,填充到插有铜导线的两个电极腔、压实,形成平坦表面;在 $K_1$ 碳糊电极表面滴注1ul GOD(2~4units/ul),1ul牛血清白蛋白(BSA)(20%,W/V)和0.5ul戊二醛(5%),均匀混合复盖碳糊,室温交联成酶膜;在 $K_2$ 碳糊电极表面滴注1ul GOD,2ul MUT(1-2 units/ul),4ul INV(80-100 units/ul),1ul BSA和2ul戊二醛,均匀混合复盖碳糊,室温成膜。

CAT酶膜的制作:2ul CAT(4000-6000 units/ul),0.5ul BSA和0.5ul戊二醛滴注到流通池两电极之间的槽中,混均扩散,室温交联成膜。

图2为测定工作系统。

载流液为磷酸缓冲液(PBS, 0.02 mol/L, pH6.8)(1),液流驱动力由蠕动泵(2)提供,G/S样品经注射阀(3)定量注入PBS载流,经混合圈(4)混合后流经 $K_1$ (5), $K_2$ (6),Ag/AgCl参比电极(7)和对电极(8),而后被排出(9)。 $K_1$ 和 $K_2$ 输出的响应电流信号由检测器(10)检出并由记录仪(11)记录。检出信号也可通过接口电路(12)送至单片计算机进行数据处理。

图3为电极 $K_2$ 的响应信号。

当测定池中无固定化CAT时(图3A), $K_2$ 的响应峰有较长的拖尾,表明电极洗脱回复时间长(约5-6min),不能迅速进入第二轮测定,其原因



因是 $K_1$ 表面的酶促反应产生的 $H_2O_2$ 部分地扩散至 $K_2$ , 导致 $K_2$ 的持续响应。在两电极间固定一层CAT后(图1),  $H_2O_2$ 由 $K_1$ 向 $K_2$ 扩散的途中被CAT转化成 $H_2O$ 和 $O_2$ , 使 $K_2$ 的响应峰拖尾消失, 电极迅速被洗脱回复(图3B), 所产生的 $O_2$ 还可弥补因 $K_1$ 耗氧而可能造成 $K_2$ 的供氧不足。

测定G/S样品时采用两点标定法(two-point calibration)。分别用线性范围内的两种浓度的标准葡萄糖溶液和两种浓度的标准蔗糖溶液注射, 以响应值为 $Y$ , 浓度值为 $X$ , 建立线性方程。

$$Y_1 = a_1 + b_1 X_G \quad (1)$$

$$Y_2 = a_2 + b_2 X_G \quad (2)$$

$$Y_3 = a_3 + b_3 X_S \quad (3)$$

这里, 式(1)为 $K_1$ 的葡萄糖浓度—应值校准式, 式(2)为 $K_2$ 的葡萄糖浓度—响应校准式, 式(3)为 $K_2$ 的蔗糖浓度—响应值校准式,  $X_G$ 为葡萄糖浓度,  $X_S$ 为蔗糖浓度。当样品为G/S时,  $K_2$ 的响应值为 $Y_t$ 。

$$Y_3 = Y_t - Y_2$$

$$Y_t - (a_2 + b_2 X_G) \quad (4)$$

在高的载流速度下(>1ml/min),  $K_1$ 消耗的葡萄糖对样品中总的葡萄糖量可忽略不计, 式(2)中的 $X_G$ 与式(1)中的 $X_G$ 近似相等, 于是(1)和(2)可以联立, 解出 $X_G$ 并代入(4), 得

$$Y_3 = Y_t - [a_2 + b_2 (Y_1 - a_1) / b_1] \quad (5)$$

重排式(3)解出 $X_S$ 并代入式(5), 得

$$X_S = \{Y_t - [a_2 + b_2 (Y_1 - a_1) / b_1] - a_3\} / b_3 \quad (6)$$

该式即为双电极复合酶传感器测定并求蔗糖浓度 $X_S$ 的基本计算式, 式中 $a_n$ 和 $b_n$ 由两点标定法得出, 进行G/S样品测定时, 一次注样, 便同时测出蔗糖和葡萄糖浓度。

倘若 $a_n \ll b_n$ , 式(6)可简化为

$$X_S = (Y_t - b_2 Y_1 / b_1) / b_3 \quad (7)$$

此时可采用单点标定法, 使用一种浓度标定液即可

在该实施例中, 测定纯的葡萄糖或蔗糖(1mmol/L, 进样量50ul)变导系数 $CV < 4\%$  ( $n=9$ ), 测定G/S样品中的蔗糖(1mmol/L),  $CV < 6.5\%$  ( $n=9$ )。

关于葡萄糖对蔗糖测定的干扰评价, 设 $K_2$ 电极对纯蔗糖溶液线性范围内最高浓度的响应值为 $K_{3max}$ , 在对G/S测定时, 若 $Y_t < 70\% K_{3max}$ , 葡萄糖浓度对蔗糖测定的干扰可忽略不计。

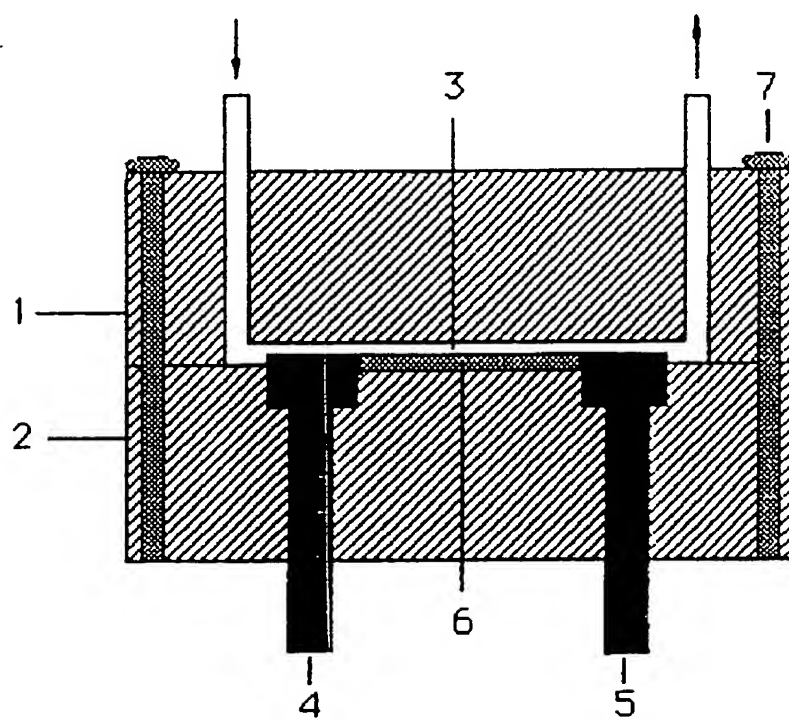


图 1

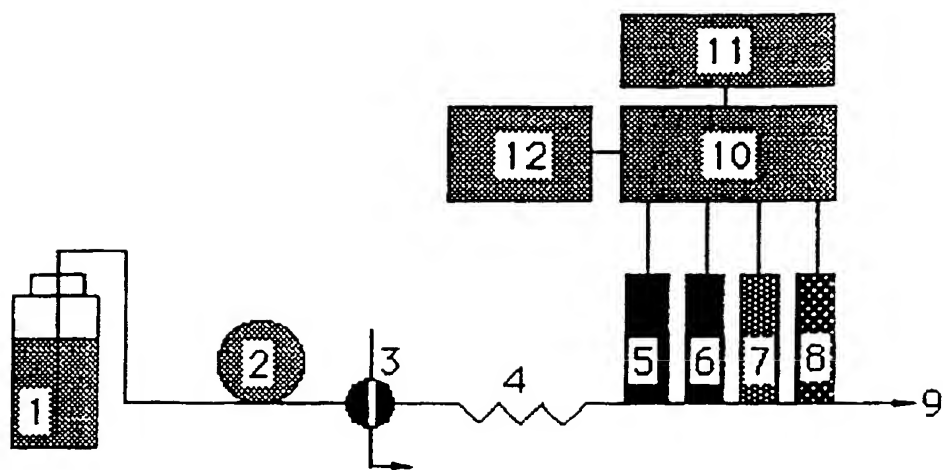
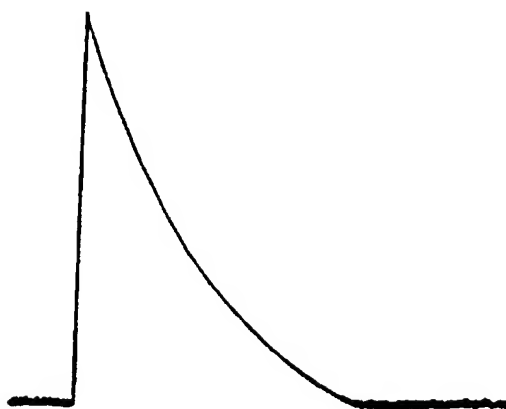
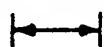


图 2

A)



2 min



B)

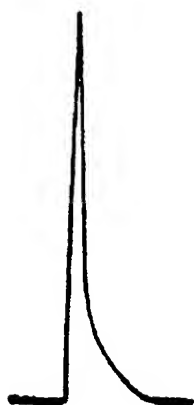


图 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**